Der Purinquotient von Ringelnatterembryonen

Verkürzte Fassung der

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Robert Zinkernagel
aus Riehen, Basel-Stadt

Basel 1939

Genehmigt von der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der

Herren Professoren S. Edlbacher und Ad. Portmann.

Basel, den 28. Juni 1938

Prof. M. Reinhard
Dekan

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Herrn Robert Zinkernagel wurde von der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 10. Mai 1939 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel: „Embryochemische Untersuchungen an Natrix natrix, ein Beitrag zur Kenntnis der Entwicklung des Reptilieneies" kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Zoologischen Institut der Universität Basel;
2. im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Basel;
3. in der Universitätsbibliothek Basel;
4. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.

Separatabdruck aus „Biochemische Zeitschrift", Band 301, Heft 5/6, 1939

Verlag von Julius Springer in Berlin

Seit *Ernst Miescher* die Purine als Bestandteil der Zellkernsubstanz erkannt hat, sind diese Stoffe von verschiedenen Gesichtspunkten aus untersucht worden. So sind *Wiener* (1902), *Schuler* (1935), *Edlbacher* (1936) u. a. in ihren Untersuchungen der Frage der Purinbildung nachgegangen. Es lag auch nahe, den Purinstoffwechsel der Zelle mit der Harnsäureexkretion in Zusammenhang zu bringen. So ist die Purinsynthese als Aufbauvorgang beim Wachstum und als Abbauprodukt beim Exkretionsprozeß erforscht worden.

Durch die quantitative Erfassung der Purine lassen sich auch Schlüsse auf die Quantität der Kernsubstanz ziehen. Solche Bestimmungen ermöglichen von chemischer Seite aus an die Kernplasmarelation (= K. P. R.) heranzutreten. Der von *Richard Hertwig* (1903) zuerst geäußerte Gedanke eines gesetzmäßigen Verhältnisses von Kern- zu Plasmamasse der tierischen Zelle wurde von *Godlewski* (1921) und seiner Schule einer ganzen Reihe von Untersuchungen zugrunde gelegt. Die hier in histologisch-quantitativem Sinne, d. h. bezüglich ihrer Dimensionen aufgefaßte Relation wurde später von *Jakoby* (1925) dahin ausgewertet, daß auf Grund *Heidenhains* Protomerentheorie nur noch die Kerngröße gemessen und daraus auf die Plasmamenge geschlossen wurde. Später haben sich noch andere (*Clara* 1933, *Voss* 1928, *Wermel* und Mitarbeiter 1932) dieser Methode bedient. Welche Fehlerquellen durch Fixation und Messung die morphologischen Untersuchungsmethoden der K. P. R. in sich bergen, hat in jüngster Zeit *Richard Meyer* (1936) nachgewiesen.

Gestützt auf die Untersuchungen von *Ernst Miescher* hatte *Albert Kossel* (1882) mit chemischen Methoden Änderungen der Kernmasse eines Gewebes quantitativ zu erfassen versucht. Von diesen Versuchen ausgehend führten *Le Breton* und *Schaeffer* (1923) den Begriff der chemischen K. P. R. ein.

Während die rein quantitative histologische K. P. R. die dimensionalen Verhältnisse der Zelle berücksichtigt, stützt sich die chemische

K. P. R. mehr auf die Kenntnisse von den Eiweiß-, Pyrimidin- und Purinkomponenten der Zelle. Bei der chemischen Untersuchung der K. P. R. glaubt man durch Bestimmung solcher Komponenten in Kern und Plasma eine Unterscheidung der Gewebefeinheiten, die jenseits des morphologisch Sichtbaren liegen, erreicht zu haben; und zwar in dem Sinne, als nach der jetzigen Auffassung die stofflichen Vorgänge, die sich als Lebensprozesse manifestieren, in hervorragendem Maße an eiweiß- und andere stickstoffhaltige Körper gebunden sind und die zunächst in chemischem Sinne Struktur sind und erst in zweiter Linie als morphologische Struktur in Erscheinung treten.

Die chemische K. P. R. nach *Le Breton* und *Schaeffer* stützt sich auf den Stickstoffanteil der Fraktionen und läßt sich in der Beziehung

$$\frac{\text{Purinstickstoff} \cdot 100}{\text{Totalstickstoff} - \text{Purinstickstoff}}$$

ausdrücken. Es leuchtet ein, daß dieser Quotient nicht das Verhältnis des Kernstickstoffs zum Plasmastickstoff exakt angibt, da der Kern außer den Purinen noch andere Stickstoffkomponenten enthält. Daher haben *v. Euler* und *Schmidt* (1934) und anschließend *Edlbacher* und *Jucker* (1936) den Purinstickstoff auf den Gesamtstickstoff bezogen, was eine weitere kleine Abweichung von dem eigentlichen Stickstoffverhältnis von Kern zu Plasma bedeutet. Die abgeänderte Beziehung lautet nun:

$$\frac{\text{Purinstickstoff} \cdot 100}{\text{Gesamtstickstoff}},$$

d. h. der Purinstickstoff wird in Prozenten des Gesamtstickstoffs ausgedrückt. Diese Zahl wird als Purinquotient bezeichnet.

Es ist schon betont worden, daß der Kern außer Purinen noch Pyrimidin und Eiweißkörper als stickstoffhaltige Substanzen enthält. Der Schluß auf die K. P. R. kann aber insofern gezogen werden, als anzunehmen ist, daß in dieser Relation das Verhältnis von Kern zu Plasma indirekt umschrieben sei. Auch außerhalb der Kerne können in ganz geringem Maße Purine auftreten, z. B. im Muskel. Die Theorie, daß die Purine für den Kern charakteristisch sind, ist weitgehend gestützt. So hat in letzter Zeit *Koller* (1936) mit der Methode von *Gerhard Schmidt* bewiesen, daß in kernlosen Erythrocyten von Mensch und Rind praktisch keine Purine gefunden werden. Dagegen zeigten die kernhaltigen Vogelerythrocyten (Huhn) einen beträchtlichen Puringehalt (etwa $3^1/_2\%$ Purinstickstoff). Mit größter Wahrscheinlichkeit darf also angenommen werden, daß eine Änderung des Purinstickstoffgehalts nicht nur eine Änderung der Purinmenge, sondern auch eine gleichsinnige Änderung der Kernmasse überhaupt bedeutet.

Im Zusammenhang mit der anderen Problemstellung, der Frage nach der Purinsynthese im embryonalen Organismus, zu deren Erörterung diese Arbeit ebenfalls einen Beitrag zu leisten versucht, sei noch kurz auf eine Theorie *Needhams* hingewiesen. *Needham* weist in der Chemical Embryology (1932), Section 9, 15, darauf hin, daß Embryonen, die sich auf dem Lande entwickeln bzw. cleidoische Eier bilden, ihre Stickstoffexkrete hauptsächlich in Form von Harnsäure ausscheiden. Dieses Faktum wird als eine der Organisationsbedingungen für die Existenzmöglichkeit des cleidoischen Eies angeführt. Es sei, führt *Needham* S. 1159 aus, interessant festzustellen, daß bei den Tieren, die Harnsäure als Endprodukt des Stickstoffwechsels bereiten, im Embryonalleben eine bemerkenswerte Purinsynthese festgestellt wird, wo aber Ammoniak und Harnstoff die Endprodukte des Eiweißstoffwechsels darstellen, sei das Ei mit genügender oder fast genügender Menge von Purinen vom mütterlichen Organismus her ausgerüstet.

Needhams Theorie ist deshalb hervorzuheben, weil sie den Zusammenhang zwischen Purinstoffwechsel und Exkretion von der phylogenetischen Betrachtungsweise her zu erfassen sucht. Diese Theorie wird von verschiedener Seite gestützt. Aus der Schule von *Tomita* (1935) liegen Untersuchungen an Hühnereiern vor, die zeigen, daß beim Vogel eine vollständige Purinsynthese während der Embryonalperiode stattfindet. Andererseits wissen wir durch *J. Needham* und *D. Needham* (1930), daß den reifen Eiern von wirbellosen und von Wirbeltieren mit aquatiler Embryonalzeit merkliche Purinmengen, bis zu 100% der für die Embryonalperiode nötigen Menge, vom mütterlichen Organismus mitgegeben werden.

Die vorliegende Arbeit mag insofern als Beitrag zur Diskussion der Theorie *Needhams* gewertet werden, als in einer experimentellen Untersuchung, außer der Bestimmung des Purinquotienten, nachzuweisen versucht wird, daß während der Embryonalperiode der Ringelnatter (Natrix natrix) eine Purinsynthese stattfindet.

Material.

Die Untersuchung wurde an Eiern von Natrix natrix durchgeführt. Es kamen Eier der dalmatinischen und mitteleuropäischen Rasse zur Verwendung. Da die beiden Rassen nur unbedeutende Merkmalsunterschiede aufweisen, wurden ihre Eier für die zu untersuchenden Punkte als gleichwertig betrachtet.

Die Gelege von 5 bis 12 Eiern wurden möglichst gleich nach der Ablage unter kontrollierte Verhältnisse gebracht. Die frischen Gelege kamen in einen Thermostaten und wurden bei 30° C ausgebrütet. Das Schlüpfen erfolgte bei dieser Temperatur genau nach 30 Tagen. Diese 30 Tage umfassen nicht die ganze Embryonalperiode der Ringelnatter, da sich die Eier im Ovidukt bereits zu entwickeln beginnen. Diese Tatsache wird von

A. Portmann (1935) hervorgehoben und die Embryonalzeit im Ovidukt auf etwa 12 Tage angegeben.

Die individuellen Gewichtsunterschiede der Ringelnattereier sind bei dem hier untersuchten Material sehr groß. Sie sind nicht nur durch verschiedenen Wassergehalt, sondern auch durch verschiedenes Trockengewicht bedingt.

Innerhalb der 30 kontrollierbaren Tage wurden der 4., 16. und 24. Tag zur Purinbestimmung ausgesucht. Dabei wird der Tag, an dem das Ei in den Thermostaten verbracht wurde, als erster Tag gezählt. Im gewünschten Entwicklungsstadium wurden die Eier in Äthylalkohol konserviert und in diesem Zustand verarbeitet.

Methodisches.

Zur Bestimmung der Purine in den Geweben wurde das Verfahren von *Gerhard Schmidt* (1932 und 1933) angewandt, das *v. Euler* und *Schmidt* zur Bestimmung des Puringehalts der Organe wachsender Ratten benutzt hatten und das von *Edlbacher* und *Jucker* (1936) modifiziert worden war. Zur Kontrolle wurden einige Vorversuche an Rattenleber und -niere vorausgeschickt. Für die definitiven Versuche am Ringelnatterei konnte die Methode ohne wesentliche Abänderung so angewandt werden, wie sie bei *Edlbacher* und *Jucker* (l. c.) zu finden ist.

Das Material ließ sich für die Analyse so vorbereiten, daß durch einen Scherenschnitt das alkoholkonservierte Ei aufgeschlitzt und der Dotter mit Embryo und Schalenhaut herausgehoben wurde. Dotter und Dottersack kamen vom Embryo getrennt zur Untersuchung; Schale, Schalenhaut, Amnion und Allantois wurden verworfen. Die Vorarbeiten für den Analysengang wurden damit beendet, daß der Dotter bzw. das Embryogewebe auf einer Glasplatte mit der Schere fein zerkleinert und etwa 1 g der Substanz in einen kleinen Rundkolben abgewogen wurden. Dann konnte die Hydrolyse angesetzt werden, wie sie a. a. O. genau beschrieben ist. Die Analyse soll hier nicht wiederholt werden.

Versuche am Ringelnatterei.

Für jedes der drei Entwicklungsstadien wurden acht Bestimmungen durchgeführt und die erhaltenen Durchschnittswerte in einer Tabelle zusammengefaßt (Tabelle I). Da die in absoluten Werten ausgedrückten Gewichte die Verhältnisse der Stickstoffverteilung weniger deutlich erkennen lassen, wurden die relativen Zahlenwerte für die einzelnen Stadien zusammengestellt.

Tabelle I. Dotter.

Stadium	Gewicht pro Dotter in g	Absolute N-Menge pro Dotter in mg	N-Menge in % des Gewichts	Absolute Eiweißmenge in mg	Absolute Purin-N-Menge in mg	Purin-N in % des Gewichts	Purin-N in % des Gesamt-N
4. Tag	2,695	75,8	2,81	4,71	0,375	0,014	0,5
16. „	(8,019)	(273,7)	3,5		(1,659)	0,019	0,57
24. „	1,467	74,8	5,13	4,67	0,338	0,023	0,45

Embryo.

Stadium	Gewicht pro Embryo in mg	Absolute N-Menge pro Embryo in mg	N-Menge in % des Gewichts	Absolute Eiweißmenge in mg	Absolute Purin-N-Menge pro Embryo in mg	Purin-N in % des Gewichts	Purin-N in % des Gesamt-N
4. Tag	83	1,521	1,76	9,1	0,0593	0,070	3,94
16. „	633	8,72	1,41	52,0	0,443	0,074	5,06
24. „	1660	13,83	1,93	199	0,995	0,060	3,12

Der Gesamtstickstoff des Embryos nimmt bis zum 16. Tage zu, der relative Stickstoffanteil ab; hierzu ist zu bemerken, daß die prozentuale Abnahme des Stickstoffs im Embryo nicht der Ausdruck einer wirklichen Stickstoffabnahme ist, sondern auftritt, weil in der zweiten Entwicklungshälfte des Embryos die fettartigen Stoffe in steigendem Maße im Dotter verschwinden und im Embryo auftreten, was zahlenmäßig belegt werden kann. Das Verhältnis von Purinstickstoff zu Gesamtgewicht bleibt aber während der Zeit dasselbe. Das bedeutet eine verhältnismäßig starke Anreicherung des Embryonalgewebes an Purinen. Daß diese Anreicherung auftritt, zeigt sich im Purinquotienten, der von 4 auf 5 steigt. Diese Veränderung kündigt eine starke Differenzierung der Gewebe an. Der zunehmende Purinquotient weist auf eine stoffliche Veränderung, auf eine gewebliche Mannigfaltigkeit hin, und läßt sich als ein Ausdruck gesteigerter Differenzierung auffassen. Diese Deutung bleibt allerdings Vermutung, solange nicht die Entwicklungsstufen unter den gleichen Bedingungen histologisch untersucht sind.

Der Purinquotient fällt während der weiteren Entwicklung (bis 24. Tag) sehr stark, obwohl der absolute Purinwert steigt. Danach findet während dieser Zeit eine relative Plasmavermehrung statt. *Le Breton* und *Schaeffer* (1923), *Edlbacher* und *Jucker* (1936) konnten an anderem Material nachweisen, daß die chemische K. P. R. sich im Laufe des Wachstums zugunsten des Plasmas verschiebt. Auch morphologische Untersuchungen kommen zu dem Schluß, daß die K. P. R. sich im Laufe der Ontogenese im gleichen Sinne verändert.

Le Breton und *Schaeffer* (1923) leiten aus Beobachtungen an Maus und Schwein die Theorie ab, daß das Gefälle des Purinquotienten sich wie die Wachstumsintensität des Embryos verhält, daß also sehr großes Gefälle sehr große Wachstumsintensität bedeutet. Trägt man die für die Ringelnatterembryonen gefundenen Purinquotienten als Funktion der Zeit auf, so erhält man eine zur x-Achse konvex verlaufende Kurve. Wird die Kurve nach der obigen Theorie interpretiert, so bedeutet sie, daß erst nach dem 10. Tage eine wesentliche Wachstumssteigerung auftritt, und daß die prozentuale tägliche Gewichtszunahme vom 4. Tage über den 16. Tag zu einem gewissen Minimum hin ab-

nimmt und erst vor dem 24. Tage wieder steigt. Das läßt sich auch an Hand von Wachstumskurven verfolgen. Ob dieser Zusammenhang kausal bedingt ist, oder hier sich als zufälliges Zusammentreffen äußert, kann nicht entschieden werden.

Trägt man die absoluten Purinwerte der Embryonen als Funktion der Zeit auf, so liegen die Punkte in einer Geraden, d. h. im Embryo findet eine stete Zunahme der Purine statt. Ob aber eine tatsächliche Vermehrung der Purine im Gesamtei eintritt, kann die Bestimmung der Stickstoffverteilung sowie die der absoluten Purinmengen im Gesamtei zeigen.

Die Stickstoffverteilung im Ei ist nur übersichtlich, wenn die relativen Werte verglichen werden. Es ist so verfahren worden, daß der Gesamtstickstoff des Systems, d. i. hier Dotter plus Dottersack plus Embryo = 100 % gesetzt wird. Die Stoffanteile des Komponenten werden dazu in Relation gesetzt (Tabelle II).

Tabelle II.

	4 tägiges Ei	16 tägiges Ei	24 tägiges Ei
1. Gesamtstickstoff von Dotter und Embryo in %	100	100	100
2. Stickstoff des Dotters in % des Gesamt-N	98	88,8	70,2
3. Purinstickstoff des Dotters in % des Gesamt-N	0,485	0,53	0,31
4. Eiweißstickstoff des Dotters in % des Gesamt-N	97,5	88,3	69,7
5. Stickstoff des Embryos in % des Gesamt-N	1,97	11,2	29,8
6. Purinstickstoff des Embryos in % des Gesamt-N	0,078	0,57	0,94
7. Eiweißstickstoff des Embryos in % des Gesamt-N	1,89	10,6	28,9
8. Purinstickstoff von Dotter und Embryo in % des Gesamt-N	0,56	1,1	1,25

Bei diesem Vorgehen nimmt die Stickstoffmenge des Dotters in dem Maße ab, wie die Gesamtstickstoffmenge des Embryos zunimmt. Das ist in Wirklichkeit nicht ganz der Fall. Der Stickstoffanteil im Embryo ist etwas kleiner, da ein Teil des Dottereiweißes als Energiequelle dient und verbrannt wird. Der Stickstoff dieses Teiles wäre in der Allantoisflüssigkeit zu finden. Dieser Stickstoffteil ist nicht bestimmt worden.

Die Purinstickstoffmenge des Embryonalgewebes zeigt eine absolute Vermehrung im Laufe der Entwicklung. Im Gesamtei nimmt die absolute Purinstickstoffmenge folgendermaßen zu:

4. Tag	0,434 mg	pro	Embryo	
16. „	0,857 „	„	„	
24. „	1,333 „	„	„	

Damit ist bewiesen, daß im Ringelnatterei eine Purinsynthese stattfindet. Da die Vermehrung nicht im Dotter zu finden ist, sondern im Embryo, ist anzunehmen, daß die Purine auch im Embryonalgewebe synthetisiert werden.

Zusammenfassung.

Durch Bestimmung des Purinstickstoffs und dessen Verhältnis zum Gesamtstickstoff nach der Methode von *Gerhard Schmidt* in drei verschiedenen Embryonalstadien von Natrix natrix wurde versucht, ein Bild über die Änderung der chemischen K. P. R. und über die Purinsynthese im Sauropsidenei zu geben.

Der Purinquotient stieg zuerst von 4 am 4. Tage auf 5 am 16. Tage, um dann am 24. Tage auf 3 zu fallen. Eine Purinanreicherung war im Gesamtei zu finden. Da die Vermehrung der Purine fast ausschließlich im Embryonalgewebe stattfindet, wurde auf eine Purinsynthese im Embryo geschlossen.

Literatur.

Clara, Zeitschr. f. Anat. **99**, 1933. — *Edlbacher* u. *Jucker*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **240**, 78, 1936. — *v. Euler* u. *Schmidt*, ebenda **208**, 225, 1932. — *Dieselben*, ebenda **219**, 191, 1933. — *Dieselben*, ebenda **223**, 215, 1934. — *Godlewski*, Rev. gen. Sci. **32**, 676, 1921. — *Hertwig, Richard*, Biol. Zentralbl. **23**, 49, 1903. — *Jakoby*, Arch. f. Entw.mech. **106**, 124, 1925. — *Koller*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **244**, 23, 1936. — *Kossel*, ebenda **7**, 71, 1882. — *Derselbe*, ebenda **8**, 407, 1884. — *Le Breton* u. *Schaeffer*, Variation biochimique du rapport nucléoplasmatique au cours du développement embryonnaire, Paris, Masson & Cie., 1923. — *Dieselben*, Travaux de l'Inst. Physiol. Fac. méd. Univers. Strasbourg, 1923. — *Meyer, Richard*, Zeitschr. f. wiss. Zool. **25**, 353, 1936. — *Needham*, Chemical Embryology, Cambridge, 1931. — *Needham* u. *Needham*, C. r. Soc. Biol. **104**, 67, 1930. — *Portmann*, Rev. Suisse Zool. **42**, 395, 1935. — *Schuler* u. *Reindel*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **234**, 63, 1935. — *Tomita*, Festschrift f. *Tomita*, Nagasaki 1934. — *Voss*, Zeitschr f. Zellforsch. **7**, 1928 — *Wermel* u. Mitarbeiter, ebenda **16** u. **17**, 1932. — *Wiener*, Hofmeisters Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 42 u. 79, 1902.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546708_0025

Lebenslauf

Ich, Robert Zinkernagel, wurde als ältester Sohn des Universitätsprofessors Franz Zinkernagel und dessen Ehefrau Irma, geb. Kling, am 25. November 1911 in Tübingen geboren. In Basel, wohin mein Vater einem Rufe gefolgt war, besuchte ich die Schulen und bestand im Frühjahr 1932 am Mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasium das Maturitätsexamen. Seit dem Sommersemester 1932 bin ich an der Universität Basel immatrikuliert. Ich habe mich naturwissenschaftlichen Studien gewidmet. Mein Hauptfach wurde Zoologie. Die Nebenfächer waren Botanik, Chemie und Physik. Hauptsächlich besuchte ich Vorlesungen und Übungen folgender Dozenten: Edlbacher, Fichter, Geigy, Handschin, Portmann, Senn und Wehrli. Seit dem Sommersemester 1936 habe ich im Institut von Herrn Prof. Edlbacher an meiner Dissertation gearbeitet.

Meinen verehrten Lehrern spreche ich hiermit meinen verbindlichsten Dank aus, dies insbesondere Herrn Prof. Edlbacher für seinen Rat bei der Entstehung der vorliegenden Arbeit und Herrn Prof. Portmann für die entscheidende Förderung, die mir in jeder Weise seit Beginn meiner Studien von seiner Seite zuteil wurde.

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig
Printed in Germany